

氏 名	岩 崎 弘 登
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 5020 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項
学 位 論 文 名	Dose-Dependent Contribution of CD34-Positive Cell Transplantation to Concurrent Vasculogenesis and Cardiomyogenesis for Functional Regenerative Recovery After Myocardial Infarction (心筋梗塞に対するCD34陽性細胞移植は、心筋・血管再生効果を介して用量依存性に心機能回復に貢献する)
論 文 審 査 委 員	主 査 教 授 末 廣 茂 文      副 査 教 授 上 田 真 喜 子 副 査 教 授 葭 山 稔

### 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】末梢血中の骨髄由来CD34陽性細胞は、虚血部位の血管再生に寄与する事が証明され、虚血性疾患に対する細胞移植治療が臨床適用されるようになった。しかし、CD34陽性細胞の心筋・平滑筋細胞への多分化能を示すメカニズムは依然議論の余地がある。今回我々は骨髄由来CD34陽性細胞移植による心筋・血管再生効果を検討した。

【方法】CD34陽性細胞は、G-CSFによる骨髄からの強制動員・アフエレーシス・磁気細胞分離により、慢性重症下肢虚血患者の末梢血から採取し、低用量 (Low)、中用量 (Mid)、または高用量 (Hi) のCD34陽性細胞あるいはPBSを免疫不全ラットの心筋梗塞モデルの心筋内へ移植した。移植後 4 週目に心機能を心エコー、Millarカテーテル検査で、分化メカニズムを免疫組織化学、RT-PCR、Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) などで評価した。

【結果】心機能 (FS、 $\pm$ dP/dt) や組織学的指標 (微小血管密度、左室梗塞範囲) はCD34陽性細胞移植後に用量依存性に改善した。human nuclei antibody (HNA) とcTn-Iとの二重染色により検出されたヒト細胞、すなわち虚血部位でのヒトCD34陽性細胞由来の心筋細胞数も用量依存性に増加していた。またヒト特異的brain natriuretic peptide (BNP) 抗体を用いた免疫組織化学検査でも、ヒト特異的BNP陽性心筋細胞密度がHi群、 $2480 \pm 149$ ; Mid 群、 $1860 \pm 141$ ; Low 群、 $423 \pm 9$ ; PBS 群、 $0 \pm 0$  /mm<sup>2</sup> と用量依存性に高くなり、また移植細胞由来のヒト血管平滑筋・内皮細胞も用量依存性に再生されたことが証明された。FISH解析よりこのCD34陽性細胞の多分化能にはcell fusionによらない機序、すなわちEPCのtransdifferentiation、multipotent stem cellあるいはmultiple progenitor cellsからの心筋細胞への分化等も関与していることが確認された。さらに詳細に検討するため、虚血組織から抽出したRNAのRT-PCRにおいてもヒト特異的心筋・血管平滑筋・内皮マーカー (BNP、MHC、cTn-I、Nkx2.5、sm22 $\alpha$ 、SMA、KDR 等) の遺伝子を用量依存性に増幅発現することも判明した。

【結論】慢性重症下肢虚血患者の強制動員CD34陽性細胞は、多分化能を持ち、心筋梗塞への移植治療において用量依存性に心筋・血管再生効果を示し、機能的/組織学的な臓器再生に貢献することが証明された。心筋細胞・血管細胞の両者を再生するポテンシャルを有する点で、骨髄由来CD34陽性細胞移植は心不全、心筋梗塞治療にきわめて有用であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

重症の冠動脈疾患患者の中には、既存の薬物治療・血行再建術（カテーテル治療、バイパス手術）等の効果が不十分なために予後不良な症例も少なくなく、このような重症例に対する新しい治療法の確立が望まれている。本研究の目的は、血管内皮前駆細胞（末梢血CD34陽性細胞）移植の冠動脈疾患に対する有用性および同細胞の心筋・血管再生効果の機序を明らかにすることである。

CD34陽性細胞は、G-CSFによる骨髄からの強制動員・アフェレーシス・磁気細胞分離により、慢性重症下肢虚血患者の末梢血から採取し、低用量（Low）、中用量（Mid）、または高用量（Hi）のCD34陽性細胞あるいはPBSを免疫不全ラットの心筋梗塞モデルの心筋内へ移植した。移植後4週目に心機能を心エコー、Millarカテーテル検査で、分化メカニズムを免疫組織化学、RT-PCR、Fluorescence In Situ Hybridization（FISH）などで評価した。心機能（FS、 $\pm$ dP/dt）や組織学的指標（微小血管密度、左室梗塞範囲）はCD34陽性細胞移植後に用量依存性に改善した。human nuclei antigenとcardiac troponin-I（cTn-I）との二重染色陽性細胞密度、すなわち虚血部位でのヒトCD34陽性細胞由来の心筋細胞密度も用量依存性に増加していた。またヒト特異的brain natriuretic peptide（BNP）抗体を用いた免疫組織化学検査でも、ヒト特異的BNP陽性心筋細胞密度がHi群、 $2480 \pm 149$ ;Mid群、 $1860 \pm 141$ ;Low群、 $423 \pm 9$ ;PBS群、 $0 \pm 0/\text{mm}^2$ と用量依存性に高くなり、同様に移植細胞由来のヒト血管平滑筋・内皮細胞も用量依存性に再生されることが証明された。FISH解析よりこのCD34陽性細胞の多分化能にはcell fusionによらない機序、すなわちEPCのtransdifferentiation、multipotent stem cellあるいはmultiple progenitor cellsからの多系列細胞への分化も関与していることが確認された。さらに、虚血組織から抽出したRNAのRT-PCRにおいても、ヒト特異的心筋・血管平滑筋・内皮マーカー（BNP、MHC、cTn-I、Nkx2.5、 $\text{sm}22\alpha$ 、SMA、KDR等）の遺伝子がCD34陽性細胞移植後に用量依存性に増幅発現することも判明した。以上より慢性重症下肢虚血患者の強制動員CD34陽性細胞は、多分化能を持ち、心筋梗塞への移植治療において用量依存性に心筋・血管再生効果を示し、機能的/組織学的な臓器再生に貢献することが証明された。

本研究は、心筋梗塞に対する新しい治療法としてのCD34陽性細胞移植の有用性を証明したものであり、心筋梗塞後の再生治療の成績向上に寄与しうると考えられる。よって本研究者は、博士（医学）の学位を授与されるに値するものと判定された。